

⑨



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

**0 345 616
A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: 89109772.7

⑮ Int. Cl. 4: **C07K 17/10 , A61K 37/64 ,
A61K 47/00**

⑱ Anmeldetag: 30.05.89

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES
+ GR.

⑳ Priorität: 04.06.88 DE 3819079

㉑ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
13.12.89 Patentblatt 89/50

㉒ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

㉓ Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

㉔ Erfinder: **Crause, Peter, Dr.**
Schopenhauerstrasse 31
D-6050 Offenbach(DE)
Erfinder: **Habermann, Paul, Dr.**
Rosertstrasse 35
D-6239 Eppstein/Taunus(DE)
Erfinder: **Kramer, Martin, Prof.-Dr.**
Fichtestrasse 4
D-6200 Wiesbaden(DE)
Erfinder: **Obermeier, Rainer, Dr.**
Langenhainer Weg 14
D-6234 Hattersheim am Main(DE)
Erfinder: **Sauber, Klaus, Dr.**
Königsteiner Strasse 144
D-6232 Bad Soden am Taunus(DE)
Erfinder: **Triplier, Dominique, Dr.**
Im Kirschgarten 16
D-6239 Eppstein/Taunus(DE)

㉕ **Hirudin-Derivate mit verzögerter Wirkung.**

㉖ Die vorliegende Erfindung betrifft Hirudin-Derivate, die aus Hirudin oder dessen physiologisch annehmbaren Salz und einem Träger gebildet sind, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Thrombin-Inhibitor.

EP 0 345 616 A2

Hirudin-Derivate mit verzögerter Wirkung

Die Erfindung betrifft Hirudin-Derivate, die eine verzögerte Wirkung zeigen, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung.

Hirudine sind z.B. bekannt aus EP-A 142 860, EP-A 158 564, EP-A 158 986, EP-A 168 342, EP-A 171 024, EP-A 193 175, EP-A 200 655, EP-A 209 061, EP-A 227 938, DE 34 45 517 A1, DE 38 05 540.6 und Chang, FEBS, Bd. 164 (1983) 307. Chang zeigte u.a., daß C-terminale Verkürzungen die antithrombotische Wirkung des Hirudins stark beeinträchtigen. Auch die Bedeutung von Hirudinen für die Antikoagulationstherapie wurde hinlänglich beschrieben (z.B. P. Walsmann und F. Markwardt; Pharmazie, 36 (1981) 653). So inhibiert es spezifisch Thrombin, ist aber ansonsten pharmakologisch inert, d.h. unerwünschte Nebenwirkungen wurden bisher nicht festgestellt.

Als nachteilig für die medizinische Verwendung als Thromboseprophylaktikum kann jedoch die relativ kurze Verweildauer der Hirudine im tierischen oder menschlichen Körper (Richter et al., Haematol. 115 (1988) 64; Markwardt et al., Pharmazie 43 (1988) 202) angesehen werden.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, neue Hirudin-Derivate zu finden, die eine längere Halbwertszeit aufweisen, oder deren Elimination gering ist.

Diese Aufgabe wird überraschenderweise durch Hirudin-Derivate, gebildet aus Hirudin oder dessen physiologisch annehmbarem Salz und einem Träger, gelöst.

Als Hirudine kommen beispielsweise die in den auf Seite 1 zitierten Literaturstellen beschriebenen Verbindungen in Betracht insbesondere, die in EP-A 171 024, EP-A 158 986, EP-A 209 061 und DE 38 05 540.6 beschriebenen Verbindungen wie z.B.

20

0 1 10
Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-

20

25

Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-

30

40

Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-

30

50

Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-

60

Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

35

Diese Hirudine können nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden der Peptidchemie, siehe z.B. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/2, bevorzugt mittels Festphasensynthese wie z.B. von B. Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 85, 2149 (1963) oder R.C. Sheppard, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 118 (1983) beschrieben oder durch äquivalente bekannte Methoden hergestellt werden. Alternativ sind die genannten Hirudine auch durch dem Fachmann bekannte gentechnische Methoden zugänglich.

40

Weiterhin kommen folgende mittels gentechnologischer Methoden veränderte Hirudine in Betracht. Vorteilhaft solche, wobei z.B. zwei der drei natürlich in der Sequenz vorkommenden Lysine durch eine natürliche Aminosäure, bevorzugt Asg, Asn, ersetzt wurden. Ferner, auch solche Hirudine, die durch gezielte N- (bevorzugt Lys) bzw. C-terminale (bevorzugt Met) Verlängerung verändert wurden. Bei einer N-terminalen Verlängerung sind die im Verlauf der Sequenz vorkommenden Lysine durch eine andere natürliche Aminosäure, bevorzugt Asn, Arg, ersetzt.

45

Als Träger werden lösliche Träger, insbesondere Polysaccharide, wie z.B. Dextrane (MW 20000-75000 dt), -bevorzugt Dextrane (MW 70000 dt)- Laevane, Heparine (MW 6000-20000 dt) oder "low molecular weight" Heparine (MW <6000 dt), Polyethylenglykole (MW 1500-15000 dt) oder Gelatinepartialhydrolysate beispielsweise mit Diisocyanaten vernetzt Gelatinepartialhydrolysate (Polygeline, ®Haemacel), oder unlösliche Träger, wie z.B. Sepharosen, beispielsweise CH-Sepharose 4B (Fa. Pharmacia), Agarosen, Cellulose, Hydroxymethacrylate, die alle nach bekannten Verfahren aktiviert wurden, verwendet, insbesondere jedoch Dextrane, Heparine und low-molecular weight Heparine.

50

Das Verhältnis Hirudin zu Träger kann in den Hirudin-Derivaten sehr stark variieren. Es ist abhängig von der Art des Trägers und den Reaktionsbedingungen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der Hirudin-Derivate, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Hirudine einem aktiven Träger bei einer Temperatur von 0 °C bis 25 °C, bevorzugt bei 4 °C, umgesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Hirudin-Derivate sind wertvolle Thrombin-Inhibitoren, die sich insbesondere durch eine verlängerte Halbwertszeit auszeichnen, was wiederum eine umfassende Anwendung z.B. in der Thromboseprophylaxe ermöglicht.

So werden die Hirudine und Hirudin-Derivate beispielsweise vorteilhaft verwendet bei der Oberflächenbeschichtung von Herzklappen, (z.B. aus Kunststoff), künstlichen Gefäßen, Kathedern von biokompatiblen medizinischen Geräten oder von Filtern, Membranen und Materialien wie z.B. Keramiken, der gebräuchlichen Hämdialyseapparaturen.

Bei der Bestimmung und dem Nachweis von relevanten Blutkomponenten stellt sich das Problem, daß das zu untersuchende Blut vorbehandelt werden muß. Dies kann Probleme für die Aussagekraft solcher Tests mit sich bringen. Teströhrchen, die mit Hirudin beschichtet sind, eröffnen dem Praktiker neue Möglichkeiten.

Ferner finden Hirudine und Hirudin-Derivate Anwendung in Implantaten, die u.a. auch für die verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs verwendet werden, z.B. osmotische Minipumpen, biologisch abbaubare Mikrokapseln, Rods, Liposomenpräparate.

Die erfindungsgemäßen Hirudin-Derivate zeigen, daß sich Hirudine mit hochmolekularen Trägermaterialien umsetzen lassen, wobei überraschenderweise die Hirudinaktivität erhalten bleibt. Das pharmakokinetische Verhalten des Hirudins ändert sich vorteilhaft. Injiziert man Hirudin und Dextran-Hirudin in einem vergleichenden Experiment Ratten und mißt mittels eines Thrombinhemmtestes die Plasmakonzentration, so ist nach einer Stunde mit der ca. 10-fach geringeren Menge an Dextran-Hirudin eine Thrombinhemmung meßbar. Ein weiterer Vorteil liegt überraschend in der Verlängerung der Halbwertszeit. Sie beträgt für Dextran-Hirudin 6 bis 7 Stunden, während sie für Hirudin 1 bis 2 Stunden (Markwardt et al. Pharmazie 43 (1988) 202) beträgt.

Die nachfolgenden Beispiele, in denen das in der deutschen Patentanmeldung 38 05 5406 beschriebene Isohirudin ('Leu-Thr-Hirudin') verwendet wird, sollen die Erfindung erläutern, jedoch ohne auf diese einzuschränken. Es ist dem Fachmann geläufig, daß alle bekannten Hirudine äquivalent zu dem eingesetzten Hirudin mit einem Träger umgesetzt werden können und auch die auf Seite 2 beschriebenen Hirudine. Dabei können sich die Bedingungen für einzelne Reaktionen ändern.

Beispiel 1 Herstellung von Hirudin

Die Synthese von Hirudin erfolgt beispielsweise in Hefezellen, die Hirudin gemäß der deutschen Patentanmeldung P 38 05 540.6 (HOE 88/F 043) ausschleusen. Hirudin wird anschließend über HP20-Säulenchromatographie (deutsche Patentanmeldung P 37 38 541.0; HOE 87/F 337) angereichert. Nach Dialyse und anschließender Affinitätschromatographie über Thrombin-Sepharose (Walsmann, P.: Pharmazie 36 (1981) 860-861) erfolgt die endgültige Reinigung über "reversed phase" HPLC.

Die Synthese kann aber auch mittels anderer bekannter gentechnischer oder peptidchemischer Methoden erfolgen.

Beispiel 2 Applikation von Hirudin und anschließender Thrombin-Hemmtest

Weibliche und männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 300 g werden mit Ethylurethan (1,5 g/kg i.p.) betäubt. Den Ratten werden 1000 AT-U/kg von einem Hirudin-Derivat bzw. authentischem 'Leu-Thr-Hirudin', welches in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, i.v. appliziert. Zur Blutentnahme wird den Tieren ein Katheder in die Karotis implantiert. Zur Bestimmung der Anti-Thrombinaktivität wird den Tieren Blut entnommen und mit Citrat behandelt. 0,1 ml des so behandelten Blutes werden mit 0,2 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 mol/l; pH 7,4) gemischt und bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zusatz von 0,1 ml einer Thrombinlösung (10 NIH-U/ml) wird die Gerinnungszeit mittels eines Koagulometers nach Schnitger und Gross bestimmt. Parallel zu dem Experiment wird eine Eichkurve mit Referenzplasma angelegt, aus der die jeweilige Plasma-Hirudin- bzw. Plasma-Hirudin-Derivat-Konzentration abgelesen wird.

Beispiel 3 Dextran-Hirudin

- Die 'Kopplung' von 'Leu-Thr-Hirudin' an Dextran (MW 70000 dt) erfolgt nach der Methode von Parikh, J. et al. Meth. Enzymol 34 (1974) 77. Dazu wird das Dextran durch Behandlung mit Meta-Perjodat bei 4 ° C aktiviert und anschließend dialysiert und lyophilisiert. 2 g aktiviertes Dextran werden dann in 285 ml 0,1 mol/l Natriumphosphat-Puffer (pH 8,8) bei Raumtemperatur gelöst, die Lösung auf 4 ° C abgekühlt, 20 mg Hirudin zugegeben und 14 Stunden bei 4 ° C inkubiert. Danach werden 75 ml abgetrennt und lyophilisiert. nachdem die wiedermolekularen Puffersalze durch Gelfiltration (Sephadex G-25, 1 cm x 100 cm) entfernt wurden, wird die Lösung erneut lyophilisiert.
- Die Reaktion findet mindestens zwischen einem der drei Lysine und dem aktivierten Dextran statt.
- Zur Reduktion der gebildeten Schiff'schen Base werden 75 mg NaBH₄ zu den 75 ml der inkubierten Lösung gegeben, 40 Minuten bei 4 ° C gerührt und anschließend die Lösung gegen Wasser für 24 Stunden bei 4 ° C dialysiert (Membran: Servapor Dialysis Lubing; Diameter 10 mm, Fa. Serva Feinbiochemica GmbH Heidelberg). Dann eine Gelfiltration über Sephadex G-25 und eine Lyophilisation. Das Dextran-Hirudin wird mittels Thrombin-Sepharose-Affinitätschromatographie entsprechend Beispiel 1 gereinigt. Die Bestimmung der Dextran-Hirudin-Aktivität erfolgt gemäß der Methode von Griesbach et al. (Thromb. Res. 37 (1985) 347-350). Dabei wird die Hemmung der Thrombin-katalysierten Spaltung von Chromozym TH gemessen. Bezogen auf die molare Basis entspricht die gemessene Aktivität der von Hirudin. Das so gereinigte Dextran-Hirudin wird gemäß Beispiel 2 Wistar-Ratten i.v. appliziert. Nach 1 Stunde wird eine entdeckbare Konzentration im Plasma der Ratten gefunden. Dies kann im Vergleichsexperiment nur mit der ca. 10fach höheren Dosis von Hirudin beschrieben werden. Verfolgt man die Hirudinkonzentration des Plasmas weiter, so findet man eine Halbwertszeit der Eliminierung der Substanz von 6-7 Stunden. Dies ist eine deutliche Verlängerung gegenüber Hirudinen (1-3 Stunden).
- Die verwendeten Versuchstiere zeigen keine Beeinträchtigung in ihrem Befinden.

Beispiel 4 Sepharose-Hirudin

- 8 mg Hirudin werden in 2 ml 0,1 M NaHCO₃ und 0,5 M NaCl bei pH = 8,0 gelöst. 400 mg aktivierte CH-Sepharose 4 B (Pharmacia) werden nach Herstellervorschriften gequollen. Dann wird die Proteinlösung zu dem Träger gegeben und 1,5 Stunden bei 23 ° C stengelassen. Danach wird abgesaugt und das Immobilisat zur Inaktivierung restlicher Bindungsgruppen 1 Stunde lang in 0,1 M TRIS, pH = 8,0, stengelassen. Anschließend wird der Träger nach Herstellungsvorschrift gewaschen.
- Die Protein-Kopplungsausbeute beträgt 5 %. Die biologische Aktivität wird in Nitro nach Beispiel 2 bestimmt. Aus dem behandelten Plasma wird das Sepharose-Hirudin isoliert, mit einer 1 bis 1,5 M NaCl-Lösung gewaschen und erneut im Hemmtest eingesetzt. Die gemessene Aktivität liegt innerhalb der Fehlergrenze der 1. Messung.

40 Ansprüche

1. Hirudin-Derivate, gebildet aus Hirudin oder dessen physiologisch annehmbaren Salz und einem Träger.
2. Hirudin-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Polysaccharid ist.
3. Hirudin-Derivate gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Dextran oder ein Heparin ist.
4. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger "low molecular weight" Heparin ist.
5. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin

0 1 10
 Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-
 20
 5 Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-
 30 40
 Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-
 10 50
 Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-
 60
 15 Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

6. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Hirudin Lys 26 und Lys 35 oder Lys 35 und Lys 46 oder Lys 26 und Lys 46 jeweils durch eine natürliche Aminosäure ersetzt sind.
- 20 7. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Hirudin Lys 26 durch Asn und Lys 35 oder Lys 46 durch Arg ersetzt sind.
8. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin N-terminal nun verlängert ist und Lys 26, Lys 35 und Lys 46 durch andere natürliche Aminosäuren ersetzt sind.
- 25 9. Hirudin-Derivat gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin C-terminal um eine natürliche Aminosäure verlängert ist.
10. Verfahren zur Herstellung eines Hirudin-Derivates, dadurch gekennzeichnet, daß Hirudin mit einem aktivierten Träger bei einer Temperatur von 0 °C bis 25 °C umgesetzt wird.
- 30 11. Verwendung von Hirudin-Derivaten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 als Thrombin-Inhibitor.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR

- 35 1. Verfahren zur Herstellung eines Hirudin-Derivats, gebildet aus Hirudin oder dessen physiologisch annehmbaren Salz und einem Träger dadurch gekennzeichnet, daß Hirudin mit einem aktivierten Träger bei einer Temperatur von 0 °C bis 25 °C umgesetzt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Polysaccharid ist.
- 40 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Dextran oder ein Heparin ist.
4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger "low molecular weight" Heparin ist.
5. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin
- 45

50

55

0 1 10
 Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-
 20
 5 Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-
 30 40
 Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-
 10 50
 Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-
 60
 15 Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln ist.

6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Hirudin Lys 26 und Lys 35 oder Lys 35 und Lys 46 oder Lys 26 und Lys 46 jeweils durch eine natürliche Aminosäure ersetzt sind.

20 7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Hirudin Lys 26 durch Asn und Lys 35 oder Lys 46 durch Arg ersetzt sind.

8. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin N-terminal um eine natürliche Aminosäure verlängert ist und Lys 26, Lys 35 und Lys 46 durch eine andere natürliche Aminosäure ersetzt sind.

25 9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Hirudin C-terminal um eine natürliche Aminosäure verlängert ist.

10. Verwendung von Hirudin-Derivaten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 als Thrombin-Inhibitor.

30

35

40

45

50

55

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 345 616 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **89109772.7**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 17/10, A61K 37/64,
A61K 47/00**

(22) Anmeldetag: **30.05.89**

(30) Priorität: **04.06.88 DE 3819079**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
13.12.89 Patentblatt 89/50

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(96) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **20.03.91 Patentblatt 91/12**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: **Crause, Peter, Dr.**
Schopenhauerstrasse 31
W-6050 Offenbach(DE)
Erfinder: **Habermann, Paul, Dr.**
Rosserstrasse 35
W-6239 Eppstein/Taunus(DE)
Erfinder: **Kramer, Martin, Prof.-Dr.**
Fichtestrasse 4
W-6200 Wiesbaden(DE)
Erfinder: **Obermeier, Rainer, Dr.**
Langenhainer Weg 14
W-6234 Hattersheim am Main(DE)
Erfinder: **Sauber, Klaus, Dr.**
Königsteiner Strasse 144
W-6232 Bad Soden am Taunus(DE)
Erfinder: **Tripier, Dominique, Dr.**
Im Kirschgarten 16
W-6239 Eppstein/Taunus(DE)

(54) **Hirudin-Derivate mit verzögerter Wirkung.**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft Hirudin-Derivate, die aus Hirudin oder dessen physiologisch annehmbaren Salz und einem Träger gebildet sind, ein Verfahren zu deren Herstellung und dessen Verwendung als Thrombin-Inhibitor.

EP 0 345 616 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 9772

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 187 361 (HOECHST) * Ansprüche 1,4; Seite 6, Zeile 36 * - - -	1-4,10	C 07 K 17/10 A 61 K 37/64 A 61 K 47/00
Y		5,9	
Y,D	EP-A-0 158 986 (HOECHST) * Anspruch 1 * - - -	5,9	
Y,D	EP-A-0 209 061 (HOECHST) * Anspruch 1 * - - - - -	5,9	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) C 07 K A 61 K
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 09 Januar 91	Prüfer PEETERS J.C.
<div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div> <div>E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument §: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div>			